

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-233086

(43) 公開日 平成7年(1995)9月5日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/44				
38/16	AFK			
38/00				

A 6 1 K 37/ 50

37/ 14 AFK

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平6-27049
(22) 出願日	平成6年(1994)2月24日

(71) 出願人	000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
(72) 発明者	山根 義久 鳥取県倉吉市八屋214の10
(74) 代理人	弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 動物皮膚病治療剤

(57) 【要約】

【構成】 少なくとも3% (重量) のラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物、この加水分解物から分離されたペプチド、これらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有する合成されたペプチド、またはこれらの2以上の混合物、及び少なくとも1% (重量) のラクトパーオキシダーゼを有効成分として含有する動物皮膚病治療剤。

【効果】 動物の皮膚病を効果的に治療することができ、治療に際し副作用を示さず、かつ使用者も安全に取り扱うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも3%（重量）のラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物、この加水分解物から分離されたペプチド、これらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有する合成されたペプチド、これらのペプチドの誘導体、またはこれらの2以上の混合物、および少なくとも1%（重量）のラクトパーオキシダーゼを有効成分として含有する動物皮膚病治療剤。

【請求項2】 ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物、この加水分解物から分離されたペプチド、これらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有する合成されたペプチド、これらのペプチドの誘導体、またはこれらの2以上の混合物を4～10%（重量）含有する、請求項1の動物皮膚病治療剤。

【請求項3】 ラクトパーオキシダーゼを2～5%（重量）含有する請求項1または2の動物皮膚病治療剤。

【請求項4】 ペプチドが、配列番号1～配列番号31に記載された配列を有する請求項1、2または3の動物皮膚病治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】この発明は、動物皮膚治療剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、愛玩哺乳動物、家畜等の皮膚に発生する疾病に対して安全かつ有効な外用治療剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】ラクトフェリンは、生体内では、涙、唾液、末梢血、乳汁（牛乳では約200mg/l）等に含まれ、分子量約80,000の天然の鉄結合蛋白質であり、大腸菌、カンジダ菌、クロストリジウム菌等の有害微生物に対して抗菌作用を示すこと（引用文献18）、およびブドウ球菌及び腸球菌に対して、0.5～30mg/mlの濃度で抗菌作用を有することが知られている（引用文献19）。

【0003】更に、ラクトフェリンは、抗菌作用の他、細胞増殖促進、過酸化脂質生成抑制、免疫関連細胞の機能調節、鉄吸収促進、ヒスタミン遊離抑制、抗炎症、大腸菌の腸管付着阻止及び抗ウイルスの各作用（引用文献20）及び抗酸化作用（引用文献21）を有することが知られている。また、各種の生理的効果を有するペプチドが知られており、微生物に対する抗菌作用を有するペプチドも、多数報告されている（引用文献23～39）。

【0004】この発明の発明者等も、ラクトフェリンを蛋白分解酵素で加水分解物した分解物、この分解物から単離したペプチド、およびこれらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有する合成されたペプチドが、各種微生物に対する抗菌活性を有することを見出し、既に特許出願している（引用文献40～45）。一方、過酸化水素か

ら1個の酸素原子をその受容体分子へと受け渡す反応を触媒する酵素であるパーオキシダーゼは、ワサビ、イチジクの液汁、哺乳動物の白血球、乳汁等に含まれているが、とくに乳中（牛乳では約30mg/l）に存在するものは、ラクトパーオキシダーゼと呼ばれている。ラクトパーオキシダーゼは、ホルフィリン様構造を有する分子量約82,000のヘム蛋白質であり、チオシアン酸イオンおよび過酸化水素（またはその前駆物質）の存在下で抗菌作用を示すことが公知であり（引用文献22）、LP系またはLPOシステムと呼ばれている。

【0005】以上のような抗菌性等の作用により、ラクトフェリンは、飲食品、化粧品、飼料等に利用されている（引用文献4～12）。同様に、ラクトパーオキシダーゼも、飲食品、飼料等に利用されている（引用文献13～16）。さらに、前記ラクトパーオキシダーゼは、ラクトフェリンにより酵素活性を増強することが見出されており（引用文献17）、特開昭61-83131号公報にはラクトフェリンとLP系を同時に含有してなり、胃腸管内において抗バクテリア作用を示す飲食品または飼料が開示されており、特開平5-92927号公報にはラクトフェリンとラクトパーオキシダーゼを養殖水生動物の病原菌感染予防および治療に使用できることが開示されている。

【0006】しかしながら、ラクトフェリンとラクトパーオキシダーゼの混合物が動物の皮膚病の治療に有効であることは従来知られておらず、またそのような事実を記載した刊行物も皆無である。動物の皮膚に発生する疾病には、湿疹、じん麻疹、アレルギー性皮膚炎、掻痒性皮膚炎、化膿性皮膚炎、皮膚糸状菌症、疥癬、外耳炎、耳介皮膚炎、毛のう虫症、寄生性皮膚疾患などがあげられるが、従来これらの疾病の治療には、次のような薬剤が用いられている。

①サリチル酸、フェノール、塩化ベンザルコニウム等を有効成分とする外用殺菌消毒剤（引用文献1、2）。

②ジフェンヒドラミン類等を有効成分とする抗ヒスタミン製剤（引用文献1）。

③デキサメタゾン、プレドニゾロン類、フルオシノロン、アセトニド等有効成分とする外用ステロイドホルモン剤（引用文献1）。

④カンフル、塩酸ジブカイン、アミノ安息香酸エチル、酸化亜鉛等を有効成分とする鎮痛、鎮痒、収斂、消炎剤（引用文献1）。

⑤ビチオノール、ヘキサクロロフェン、マラチオン、ニトロフラゾン、イオウ等を有効成分とする寄生性皮膚疾患用剤（引用文献1）。

γ-リノレン酸を有効成分とする皮膚病外用塗布薬剤（引用文献3）。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、動物の皮膚に発生する疾病を治療するための前記従来技術に

は、次のような問題があった。すなわち、非ステロイド系皮膚外用剤のものではその治療効果が非常に低く、またステロイド系皮膚外用剤のものは、その薬理効果は高いが、適用部位に、易感染性の亢進、皮膚の菲薄化、血管壁の脆弱化、毛包脂腺系の異常活性化といった副作用が惹起される場合があり、また、経皮吸収された薬剤によって全身的副作用が認められる可能性もある。

【0008】このような従来技術の現状から、動物の皮膚に発生する疾病を効果的にかつ安全に治療するための薬剤が要望されていた。この発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、動物の皮膚に発生する疾病に対して安全かつ有効な外用治療剤を提供することを目的としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】この発明の発明者等は、ラクトフェリンおよびラクトパーオキシダーゼの用途について鋭意研究を行っていたが、これらの物質が、動物の皮膚に発生する疾病の治療に極めて有効であることを見出し、この発明を完成した。すなわち、この発明は、上記の課題を解決するものとして、少なくとも3%（重量）のラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物、この加水分解物から分離されたペプチド、これらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有する合成されたペプチド、これらのペプチドの誘導体、またはこれらの2以上の混合物、および少なくとも1%（重量）のラクトパーオキシダーゼを有効成分として含有する動物皮膚病治療剤を提供する。

【0010】また、この発明動物皮膚病治療剤においては、ラクトフェリン類、ラクトフェリン類の加水分解物、この加水分解物から分離されたペプチド、これらのペプチドと同一のアミノ酸配列を有する合成されたペプチド、これらのペプチドの誘導体、またはこれらの2以上の混合物を4~10%（重量）含有すること、および/または上記のラクトパーオキシダーゼを2~5%（重量）含有することを好ましい態様としている。

【0011】さらに、ペプチドについては、配列番号1~配列番号31に記載の配列を有するペプチドを例示してもいる。以下、この発明について詳しく説明する。この発明の治療剤を適用することのできる動物としては、イヌ、ネコ等の愛玩動物、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタ等の家畜類などを例示することができる。また、この発明の治療剤が有効に作用する皮膚病は、たとえば皮膚糸状菌症、アトピー性皮膚炎、膿皮症、アレルギー性皮膚炎、接触性皮膚炎、化膿性外傷性皮膚炎、耳疥癬症、外耳炎などである。

【0012】この発明に使用するラクトフェリン類は、市販のラクトフェリン、哺乳動物（例えば、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等）の初乳、移行乳、常乳、末期乳等、またはこれらの乳の処理物である脱脂乳、ホエー等から常法（例えば、イオン交換クロマトグラフィー

等）により分離したラクトフェリン、それらを塩酸、クエン酸等により脱鉄したアボラクトフェリン、それらを鉄、銅、亜鉛、マンガン等の金属でキレートさせた金属飽和ラクトフェリン、各種飽和度で金属を飽和したラクトフェリンまたはそれらの2種以上の任意の混合物（以下これらをまとめてラクトフェリン類と記載することがある）のいずれであってもよいが、牛乳から分離された市販のラクトフェリンが、最も安価に得られるので好適である。この発明において使用するラクトフェリン類の加水分解物は、ラクトフェリン類をプロテアーゼまたは酸を用いて加水分解して得られるペプチドの混合物であり、例えば特開平5-320068号公報の発明により次のように製造することができる。

【0013】酸により加水分解を行う場合は、ラクトフェリン類を水溶液とし、これに無機酸または有機酸を添加し、所定温度に所定時間加熱して加水分解する。酵素により加水分解を行う場合は、ラクトフェリン類を水溶液とし、使用する酵素の至適pHに調整し、これにペプシン、トリプシン等の酵素を加え、所定温度に所定時間保持して加水分解する。加水分解後は酵素を常法により失活させる。酸または酵素による加水分解で得られた分解物は、抗菌性を有するペプチドを含有する、種々の分子量を有する分解物の混合物であり、次のようにして算出した分解度は、6~20%の範囲が望ましい。

【0014】前記分解度は、ケルダール法により測定した全窒素に対するホルモール滴定法により測定したホルモール態窒素から次式

$$\text{分解度} = (\text{ホルモール態窒素量} / \text{全窒素量}) \times 100$$

により算出した値である。前記、酸または酵素によって加水分解して得られた反応液（ラクトフェリン類分解物の溶液）は、常法により冷却し、必要に応じて常法により中和、脱塩、脱色し、更に必要に応じて常法により分画し、得られた溶液をそのまま、または濃縮して液状で、または濃縮後乾燥して粉末状で使うことができる。

【0015】この発明において使用するペプチドは、配列表に記載されたラクトフェリン類の加水分解物から分離されるペプチド、これらのペプチドと同一の合成されたペプチドまたはそれらの誘導体であり、例えば特開平78392号公報、特開平92994号公報、特開平148295号公報、特開平148296号公報、特開平148297号公報等により、次のように製造することができる。

【0016】ラクトフェリン類を酸または酵素を用いて加水分解し、分解物混合物から液体クロマトグラフィー等の分離手段によってペプチドを含む画分を得る方法、または前記のようにして得たペプチドのアミノ酸配列を公知の方法（例えば、気相シーケンサーを用いる方法等）によって決定し、前記のアミノ酸配列のペプチドを含むペプチドを公知の方法（例えば、ペプチド自動合成

装置を用いる方法)によって合成して目的とするペプチドを得る方法等によって調製することができる。これらのペプチドは、例えば配列表に記載されたアミノ酸配列を有するペプチドであり、具体的には、配列番号1、2、および27のアミノ酸配列を有するペプチド(特開平5-78392号公報)、配列番号3、4、5および6のアミノ酸配列を有するペプチド(特開平5-148297号公報)、配列番号7、8、9および31のアミノ酸配列を有するペプチド(特開平5-148296号公報)、配列番号10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20および21のアミノ酸配列を有するペプチド(特開平5-148295号公報)、配列番号22、23、24、25、26、28、29および30のアミノ酸配列を有するペプチド(特開平5-92994号公報)である。

【0017】この発明に使用するラクトパーオキシダーゼは、市販のラクトパーオキシダーゼ、哺乳動物(例えば、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウマ等)の初乳、移行乳、常乳、末期乳等、またはこれらの乳の処理物である脱脂乳、ホエー等から常法(例えば、イオン交換クロマトグラフィー等)により分離したラクトパーオキシダーゼ、またはそれらの2種以上の任意の混合物のいずれであってよいが、牛乳から分離された市販のラクトパーオキシダーゼが、最も安価に得られるので好適である。

【0018】前記ラクトフェリン類を少なくとも3%、望ましくは4~10%、前記ラクトパーオキシダーゼを少なくとも1%、望ましくは2~5%を配合し、以下公知の方法によりこの発明の動物皮膚病治療剤を得ることができる。また、この発明の動物皮膚病治療剤の剤型は、特に限定されるものではなく、担体または賦形剤として例えば、白色ワセリン、ミツロウ、流動パラフィン、グリセリン、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、軟膏基剤(アラスチベース)、シリコン、ベントナイト、アルコール、水、オリーブ油など、単独または2種以上の組合わせで適宜用い、クリーム、ペースト、ゲル、軟膏、乳液、ローションまたは溶液など各種形態に常法により製剤化され得る。

*【0019】以上のようにして製造されたこの発明の動物皮膚病治療剤は、疾患の程度にもよるが、1日1~数回患部に塗布して使用される。またこの発明の動物皮膚病治療剤は、主成分が乳成分であるため、動物が患部を管ても副作用などがなく安全であり、使用者にとっても安全である。次に試験例を示してこの発明をさらに詳しく説明する。

試験例1

この試験は、愛玩用のイヌの皮膚病に対する効果を調べるために行った。

1) 試験対象

各種の皮膚病に罹患している67匹のイヌを用いた。

2) 試験方法

前記のイヌに対して、ラクトフェリン(森永乳業社製)を50mg/mlおよびラクトパーオキシダーゼ(森永乳業社製)を30mg/mlの割合で水に溶解した治療用溶液を、綿棒、脱脂綿などに吸収させ、患部に塗布した。

3) 試験結果

この試験の結果は、表1に示すとおりである。表1から明らかなように、アトピー性皮膚炎では16例中11例が、膿皮症では15例中10例が、皮膚糸状菌症では13例中11例が、ノミアレルギー性皮膚炎では7例中5例が、外耳炎では全例が、それぞれ治癒した。また例数は少ないが、アレルギー性接触性皮膚炎では3例中2例が、化膿性外傷性皮膚炎では全例が、脂漏性皮膚炎では2例中1例が、湿疹では2例中1例が、脱毛・発赤では全例が、それぞれ治癒した。

【0020】この発明の動物皮膚病治療剤を投与した全例の70%が治癒し、20%が改善したことが明らかであり、この発明の動物皮膚病治療剤が動物の皮膚病に著効を有することが認められた。なお、他のラクトフェリン類、ペプチドを使用した場合もほぼ同様の結果が得られた。

【0021】

【表1】

疾患名	例数	結果				
		治癒	改善	不変	悪化	不明
アトピー性皮膚炎	16	11	2	1	1	1
膿皮症	15	10	3	1	1	1
皮膚糸状菌症	13	11	1	1		
ノミアレルギー性皮膚炎	7	5	1		1	
アレルギー性接触性皮膚炎	3	2	1			
化膿性外傷性皮膚炎	2		2			
外耳炎	5	5				
脂漏性皮膚炎	2	1	1			
湿疹	2	1	1			
脱毛・発赤	1		1			
毛のう虫症	1	1				

【0022】試験例2

※るために行った。

この試験は、愛玩用のネコの皮膚病に対する効果を調べ

1) 試験対象

各種の皮膚病に罹患している16匹のネコを用いた。

2) 試験方法

前記のネコに対して、試験例1と同一のラクトフェリンを50mg/mlおよびラクトパーオキシダーゼを30mg/mlの割合で水に溶解した治療用溶液を、綿棒、脱脂綿などに吸収させ、患部に塗布した。

3) 試験結果

この試験の結果は、表2に示すとおりである。表2から明らかなように、皮膚糸状菌症では5例中4例が、耳疥癬症では3例中2例が、ノミアレルギー性皮膚炎では3*10

疾患名	例数	転帰				
		治癒	改善	無音量	不変	悪化
皮膚糸状菌症	5	4		1		
耳疥癬症	3	2	1			
ノミアレルギー性皮膚炎	3	2			1	
化膿性外傷性皮膚炎	1	1				
アレルギー性接触性皮膚炎	1		1			
粟粒性皮膚炎	1	1				
脂漏性皮膚炎	1	1				
知状尾症	1		1			

【0025】試験例3

20※

この試験は、ラクトフェリン加水分解物またはペプチド類とラクトパーオキシダーゼとの混合物による治療効果を調べるために行った。

1) 試験対象

皮膚病に罹患している20匹のイヌを用いた。

2) 試験方法

前記のイヌを無作為に10匹ずつ2群に分け、1方の群には参考例2と同一の方法により製造したラクトフェリン加水分解物を50mg/mlおよび試験例1と同一のラクトパーオキシダーゼを30mg/mlの割合で水に溶解した治療用溶液を、他方の群には配列番号26のペプチド（前記分離例と同一の方法によりラクトフェリン加水分解物から分離した）を50mg/mlおよびラクトパーオキシダーゼを30mg/mlの割合で水に溶解した治療用溶液を、それぞれ綿棒、脱脂綿などに吸収させ、患部に塗布した。

3) 試験結果

この試験の結果は、表3に示すとおりである。表3から明らかなように、ラクトフェリン加水分解物を用いた場合10例中8例が、またペプチド類を用いた場合も10例中7例が治癒したことが明らかであり、この発明の動物皮膚病治療剤が動物の皮膚病に著効を有することが認められた。なお、他のラクトフェリン加水分解物またはペプチド類を使用した場合もほぼ同様の結果が得られた。

【0026】

【表3】

※

* 例中2例が、それぞれ治癒した。

【0023】この発明の動物皮膚病治療剤を投与した全例の69%が治癒し、19%が改善したことが明らかであり、この発明の動物皮膚病治療剤が動物の皮膚病に著効を有することが認められた。なお、他のラクトフェリン類、ペプチドを使用した場合もほぼ同様の結果が得られた。

【0024】

【表2】

群	例数	転帰				
		治癒	改善	無音量	不変	悪化
第1群	10	8	1	1		
第2群	10	7	2	1		

【0027】試験例4

この試験は、ラクトフェリンの有効量を調べるために行

1) 試験対象

皮膚病に罹患している70匹のイヌを用いた。

2) 試験方法

前記のイヌを10匹ずつ7群に分け、試験例1と同一のラクトパーオキシダーゼを30mg/lおよび次の割合で試験例1と同一のラクトフェリンを含有する治療用溶液を、それぞれ綿棒、脱脂綿などに吸収させ、患部に塗布した。

第1群：ラクトフェリン20mg/ml

第2群：ラクトフェリン30mg/ml

第3群：ラクトフェリン40mg/ml

第4群：ラクトフェリン50mg/ml

第5群：ラクトフェリン100mg/ml

第6群：ラクトフェリン200mg/ml

第7群：ラクトフェリン300mg/ml

3) 試験結果

この試験の結果は、表4に示すとおりである。表4から明らかなように、第1群では10例中改善が4例であったのに対して、第2群では10例中治癒および改善がそれぞれ3例、第3群～第5群ではそれぞれ10例中8例以上が治癒または改善した。また第6群および第7群でも10例中7例が治癒または改善したが、ラクトフェリ

ン含量の増加による治癒効果の上昇は認められなかった。

【0028】この結果から、ラクトフェリンを3%以上、望ましくは4~10%含有する動物皮膚病治療剤が動物の皮膚病に著効を有することが認められた。なお、ラクトフェリン類の加水分解物またはペプチドを変更した場合、ラクトパーオキシダーゼ含量を変更した場合も、ほぼ同様の結果が得られた。

【0029】

【表4】

群	例数	転帰				
		治癒	改善	無効	不変	悪化
第1群	10		4	2	3	1
第2群	10	3	3	2	1	1
第3群	10	6	2	1		1
第4群	10	7	2		1	
第5群	10	8	2			
第6群	10	7		2	1	
第7群	10	6	1	2	1	

【0030】試験例5

この試験は、ラクトパーオキシダーゼの有効量を調べるために行った。

1) 試験対象

皮膚病に罹患している70匹のイヌを用いた。

2) 試験方法

前記のイヌを10匹ずつ7群に分け、試験例1と同一のラクトフェリンを50mg/mlおよび次の割合で試験例1と同一のラクトパーオキシダーゼを含有する治療用溶液を、それぞれ綿棒、脱脂綿などに吸収させ、患部に塗布した。

第1群：ラクトパーオキシダーゼ5mg/ml

第2群：ラクトパーオキシダーゼ10mg/ml

第3群：ラクトパーオキシダーゼ20mg/ml

第4群：ラクトパーオキシダーゼ30mg/ml

第5群：ラクトパーオキシダーゼ50mg/ml

第6群：ラクトパーオキシダーゼ100mg/ml

第7群：ラクトパーオキシダーゼ200mg/ml

3) 試験結果

この試験の結果は、表5に示すとおりである。表5から明らかなように、第1群では10例中改善が2例であったのに対し、第2群では10例中治癒が5例および改善が1例、第3群では10例中治癒が6例および改善が2例、第4群および第5群ではそれぞれ10例中9例が治癒または改善した。また、第6群および第7群でも10例中8例が治癒または改善したが、ラクトパーオキシダーゼ含量の増加による治癒効果の増加は認められなかった。

【0031】この結果から、ラクトパーオキシダーゼを1%以上、望ましくは2~5%含有する動物皮膚病治療剤が動物の皮膚病に著効を有することが認められた。な

お、ラクトフェリン類の加水分解物またはペプチドを使用した場合、ラクトフェリン含量を変更した場合も、ほぼ同様の結果が得られた。

【0032】

【表5】

群	例数	転帰				
		治癒	改善	無効	不変	悪化
第1群	10		2	4	2	1
第2群	10	5	1	2	1	1
第3群	10	6	2	1		1
第4群	10	7	2		1	
第5群	10	8	1	1		
第6群	10	5	3	2		
第7群	10	7	1	1	1	

【0033】参考例1

ラクトフェリン（森永乳業社製）1kgを20リットルの脱イオン水に溶解し、チューブに入れ、400リットルの0.1Mクエン酸溶液（pH2.2）に対して、4℃で36時間透析し、更にクエン酸を除去するため、20倍量の脱イオン水に対して、4℃で24時間透析（途中、2回脱イオン水を交換）し、透析内液を凍結乾燥し、アボラクトフェリン約950gを得た。

参考例2

牛乳から分離したままの市販のラクトフェリン（ベルギーのオレオフィナ社製）50gを精製水950gに溶解し、得られた溶液に1規定の塩酸を添加してpHを2に調整し、120℃で15分間加熱し、冷却して、ラクトフェリン分解物溶液（ラクトフェリン分解物濃度：5%）約1000gを得た。このラクトフェリン分解物の分解度は9%であった。

【0034】上記のラクトフェリン分解物溶液を減圧濃縮し、凍結乾燥し、ラクトフェリン分解物の粉末約49gを得た。

参考例3

牛乳から分離したままの市販のラクトフェリン（ベルギーのオレオフィナ社製）1kgを精製水9kgに溶解し、2モル濃度のクエン酸を添加してpHを2.5に調整し、市販のブタペアシン（1:10,000、和光純薬工業社製）30gを添加し、均一に混合し、37℃で180分間保持し、85℃で10分間加熱して酵素を失活させ、のち冷却し、ラクトフェリン加水分解物約10kgを得た。このラクトフェリン加水分解物の分解度は、11.3%であった。

【0035】前記ラクトフェリン加水分解物を濃縮し、凍結乾燥し、粉末のラクトフェリン加水分解物約960gを得た。

参考例4

市販のウシラクトフェリン（シグマ社製）50mgを精製水0.9mlに溶解し、0.1規定の塩酸でpHを2.5に調整し、のち市販のブタペアシン（シグマ社製）1mgを添加し、37℃で6時間加水分解した。次

11

いで0.1規定の水酸化ナトリウムでpHを7.0に調整し、80℃で10分間加熱して酵素を失活させ、室温に冷却し、15,000rpmで30分間遠心分離し、透明な上清を得た。この上清100μlをTSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFA(トリフルオロ酢酸)を含む20%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む20~60%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、24~25分の間に溶出する画分を集め、真空乾燥した。この乾燥物を2%(W/V)の濃度で精製水に溶解し、再度TSKゲルODS-120T(東ソー社製)を用いた高速液体クロマトグラフィーにかけ、0.8ml/分の流速で試料注入後10分間0.05%TFAを含む24%アセトニトリルで溶出し、のち30分間0.05%TFAを含む24~32%のアセトニトリルのグラジエントで溶出し、33.5~35.5分の間に溶出する画分を集めた。上記の操作を25回反復し、真空乾燥し、ペプチド約1.5mgを得た。

【0036】前記ペプチドを6N塩酸で加水分解し、アミノ酸分析計を用いて常法によりアミノ酸組成を分析した。同一の試料を気相シーケンサー(アプライド・バイオシステムズ社製)を用いて25回のエンドマン分解を行ない、25個のアミノ酸残基の配列を決定した。またDTNB(5,5-ジチオビス(2-ニトロベンゾイック・アシド))を用いたジスルフィド結合分析法[アナリティカル・バイオケミストリー(A analytical Biochemistry)、第67巻、第493頁、1975年]によりジスルフィド結合が存在することを確認した。

【0037】その結果、このペプチドは、25個のアミノ酸残基からなり、3番目と20番目のシステイン残基がジスルフィド結合し、3番目のシステイン残基からN-末端側に2個のアミノ酸残基が、20番目のシステイン残基からC-末端側に5個のアミノ酸が、それぞれ結合した、配列番号26のアミノ酸配列を有していることが確認された。

参考例5

ペプチド自動合成装置(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製、LKB Biolyne 4170)を用い、シェパード等[ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサエティー・パーキンI(Journal of Chemical Society Perkin I)、第538頁、1981年]による固相ペプチド合成法に基づいて次のようにして合成した。

【0038】アミン官能基を9-フルオレニルメトキシカルボニル基で保護したアミノ酸に、N,N-ジシクロヘキシルカルボジイミドを添加して所望のアミノ酸の無水物を生成させ、このFmoc-アミノ酸無水物を合成に用いた。ペプチド鎖を製造するためにC-末端のリジン残基に相当するFmoc-リジン無水物を、そのカルボキシル基を介し、ジメチルアミノピリジンに触媒としてウルト

12

ロシンA樹脂(ファルマシアLKBバイオテクノロジー社製)に固定する。次いでこの樹脂をヒベリジンを含むジメチルホルムアミドで洗浄し、C-末端アミノ酸のアミン官能基の保護基を除去する。のちアミノ酸配列のC-末端から2番目に相当するFmoc-リジン無水物を前記C-末端アミノ酸残基を介して樹脂に固定されたリジンの脱保護アミン官能基にカップリングさせた。以下同様にして順次メチオニン、アルギニン、トリプトファン、グルタミン、トリプトファン、アルギニン、アルギニン、スレオニン、およびリジンを固定した。全部のアミノ酸のカップリングが終了し、所望のアミノ酸配列のペプチド鎖が形成された後、94%TFA、5%フェノール、および1%エタジオールからなる溶媒でアセトアミドメチル以外の保護基の除去およびペプチドの脱離を行ない、高速液体クロマトグラフィーによりペプチドを精製し、この溶液を濃縮し、乾燥して、ペプチド粉末を得た。

【0039】ここに得られたペプチドを前記参考例4と同一の方法により分析し、配列番号27のアミノ酸配列を有することを確認した。次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0040】

【実施例】

実施例1

精製水10lに、ラクトフェリン(森永乳業社製)500gおよびラクトパーオキシダーゼ(森永乳業社製)300gを溶解し、除菌フィルター(日本ミリポア工業社製)で濾過し、100mlずつ無菌的に容器に充填し、動物皮膚病治療剤98本を得た。

実施例2

親水性軟膏基剤(吉田製薬社製)840gに、ラクトフェリン(森永乳業社製)100gおよびラクトパーオキシダーゼ(森永乳業社製)60gを添加し、均一に混練し、動物皮膚病治療剤約1kgを得た。

実施例3

参考例1と同一の方法により得たアボラクトフェリンを用いたことを除き、実施例1と同一の方法により、動物皮膚病治療剤98本を得た。

実施例4

親水性軟膏基剤(吉田製薬社製)840gに、参考例3と同一の方法により製造したラクトフェリン加水分解物(森永乳業社製)100gおよびラクトパーオキシダーゼ(森永乳業社製)60gを添加し、均一に混練し、動物皮膚病治療剤約1kgを得た。

実施例5

親水性軟膏基剤(吉田製薬社製)46gに、参考例4と同一の方法により製造した配列番号26のペプチド2gおよびラクトパーオキシダーゼ(森永乳業社製)2gを添加し、均一に混練し、動物皮膚病治療剤約50gを得

た。

実施例6

参考例5と同一の方法により製造した配列番号27のペプチドを用いたことを除き、実施例5と同一の方法により動物皮膚病治療剤約50gを得た。

【0041】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明によって、動物の皮膚病を効果的にかつ副作用を生じさせることなく治療することができ、しかも使用者も安全に取り扱うことのできる動物皮膚病治療剤が提供される。

【0042】＜引用文献＞

- 1) 沢田実ら編、「1991年度版 動物用医薬品用具要覧」、社団法人日本動物薬事協会、1991年
- 2) 特開昭62-106022号公報
- 3) 特開平4-290820号公報
- 4) 特開平3-330130号公報
- 5) 特開昭61-83131号公報
- 6) ジャパン・フード・サイエンス、第27巻、第1号、第25ページ～第34ページ、1988年
- 7) サイエンス(Science)、第197巻、第263ページ～第265ページ、1977年
- 8) エー・エフ・ウィリアムス及びジェー・ディー・バウム(A. F. Williams & J. D. Baum) 編、「ヒューマンミルク・バンキング」(Human Milk Banking)、ネッスル・ニュートリション・ワークショップ・シリーズ、第5巻(Nestle's Nutrition Workshop Series Volume 5)、第133ページ～第143ページ、レーベン・プレス・ブックス社(Reven Press Books Ltd.)、1984年
- 9) デアリー・サイエンス・アブストラクツ(Dairy Science Abstracts)、第30巻、第9号、第500ページ～第510ページ、1968年
- 10) 日本小児科学会雑誌、第88巻、第7号、第1581ページ～第1582ページ、「A-43」、1984年
- 11) ザ・ジャーナル・オブ・インフェクシャス・ディゼーゼス(The Journal of Infectious Diseases)、第153巻、第2号、第232ページ～第237ページ、1986年
- 12) フランス国特許第2,596,986号明細書、1987年
- 13) ジャーナル・オブ・フード・プロテクション(Journal of Food Protection)、第51巻、第7号、第558ページ～第561ページ、1988年
- 14) ミルヒビッセンシャフト(Milchwissenschaft)、第38巻、第4号、第203ページ～第206ページ、1983年
- 15) 乳技協資料、第31巻、第5号、第2ページ～第10ページ、1982年
- 16) 特開平4-81417号公報
- 17) ザ・ジャーナル・オブ・イムノロジー(The Journal of Immunology)、第128巻、第2号、第726ページ～第731ページ、1982年

al of Immunology)、第128巻、第2号、第726ページ～第731ページ、1982年

18) ジャーナル・オブ・ペディアトリクス(Journal of Pediatrics)、第94巻、第1ページ、1979年

19) ジャーナル・オブ・デアリー・サイエンス(Journal of Dairy Science)第67巻、第606ページ、1984年

20) 酪農科学・食品の研究、第38巻、第A277ページ、1989年

21) 食品工業、第35巻、第6号、第39ページ、1992年

22) プロタイズ・オブ・ザ・バイオリジカル・フルイデス・オブ・ザ・コロキウム(Protides of the Biological Fluids, Proceedings of the Colloquium)、第32巻、第111～114ページ、1985年

23) 特開昭57-106689号公報

24) 特開昭58-13594号公報

25) 特開昭58-213744号公報

26) 特開昭59-51247号公報

27) 特開昭60-130599号公報

28) 特開昭60-172998号公報

29) 特開昭61-251699号公報

30) 特開昭63-44598号公報

31) 特開昭62-22798号公報

32) 特開昭62-51697号公報

33) 特開昭63-17897号公報

34) 特開平2-53799号公報

35) 特表平2-500084号公報

36) 特開平3-261717号公報

37) プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナルアカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユナイテッド・ステーツ・オブ・アメリカ(Proceedings of the National Academy of the Science of United States of America)、第84巻、第5449ページ～第5453ページ、1987年

38) フルミヤ・プリロードヌフ・ソエジェニエニ(Khimiya Prirodnikh Soedinenij)、第1号、第130ページ～第133ページ、1978年

39) 特開平2-53799号公報

40) 特開平2-234684号公報

41) 特開平5-92994号公報

42) 特開平5-78392号公報

43) 特開平5-148295号公報

44) 特開平5-148296号公報

45) 特開平5-148297号公報

【0043】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 11

15

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0044】

配列:

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Met Lys Lys
1 5 10

配列番号: 2

配列の長さ: 11

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0045】

配列:

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Gln Xaa Xaa Met Arg Lys
1 5 10

配列番号: 3

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0046】

配列:

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

配列番号: 4

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド
配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0047】

配列:

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

配列番号: 5

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

16

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0048】

配列:

Lys Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

配列番号: 6

10 配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0049】

配列:

Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
1 5

20

配列番号: 7

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0050】

配列:

Arg Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

配列番号: 8

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa はCys を除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0051】

配列:

Lys Xaa Xaa Xaa Arg
1 5

配列番号: 9

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

50 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラ

17

グメントとして含むペプチド。下記配列において、XaaはCysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0052】

配列:

Arg Xaa Xaa Xaa Lys

1

5

配列番号: 10

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0053】

配列:

Phe Gln Trp Gln Arg Asn

1

5

配列番号: 11

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0054】

配列:

Phe Gln Trp Gln Arg

1

5

配列番号: 12

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0055】

配列:

Gln Trp Gln Arg

1

配列番号: 13

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0056】

配列:

Trp Gln Arg

1

18

配列番号: 14

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0057】

配列:

10 Arg Arg Trp Gln Trp

1

5

配列番号: 15

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。

【0058】

20 配列:

Arg Arg Trp Gln

1

配列番号: 16

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

30

配列:

Trp Gln Trp Arg

1

配列番号: 17

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

40

配列:

Gln Trp Arg

1

配列番号: 18

配列の長さ: 6

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

50

19

20

配列:

Leu Arg Trp Gln Asn Asp

1

5

配列番号: 19

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列:

Leu Arg Trp Gln Asn

1

5

配列番号: 20

配列の長さ: 4

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列:

Leu Arg Trp Gln

1

配列番号: 21

配列の長さ: 3

配列の型: アミノ酸

配列:

Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1

5

10

15

Ser Ile Thr Cys Val

20

配列番号: 23

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Lys Cys* Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

1

5

10

15

20

Ser Ile Thr Cys* Val

20

配列番号: 24

配列の長さ: 20

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列:

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro

1

5

10

15

Pro Val Ser Cys Ile

*トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列:

Arg Trp Gln

1

配列番号: 22

配列の長さ: 20

10 配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、2番の Cysと19番の Cysがジスルフィド結合している。

【0059】

20

*

※配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列においてCys*は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

※ 【0060】

Lys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro

20

25

30

配列番号: 29

配列の長さ: 20

★配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、2番の Cysと19番の Cysがジスルフィド結合している。

【0061】

★

配列:

Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro

1

5

10

15

Pro Val Ser Cys Ile

21

22

20

配列番号: 25
 配列の長さ: 20
 配列の型: アミノ酸
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: ペプチド

* 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列においてCys*は、ジスルフィド結合の形成を防止するため、チオール基を化学的に修飾したシステインを示す。

* 【0062】

配列:

Lys Cys* Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val Arg Gly Pro
 1 5 10 15
 Pro Val Ser Cys* Ile
 20

配列番号: 26
 配列の長さ: 25
 配列の型: アミノ酸
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: ペプチド

※ 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、3番の Cysと20番の Cysがジスルフィド結合している。

【0063】

※

配列:

Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 20 25

配列番号: 27
 配列の長さ: 11
 配列の型: アミノ酸
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: ペプチド

★ 配列の長さ: 38

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、16番の Cysと33番の Cysとがジスルフィド結合している。

配列:

Lys Thr Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys 30 【0064】
 1 5 10

配列番号: 28

★

配列:

Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys
 1 5 10 15
 Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser
 20 25 30
 Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe
 35

配列番号: 29
 配列の長さ: 32
 配列の型: アミノ酸
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: ペプチド

40 ☆ 配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、10番の Cysと27番の Cysとがジスルフィド結合している。

☆ 【0065】

配列:

Thr Ile Ser Gln Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp
 1 5 10 15
 Arg Met Lys Lys Leu Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg
 20 25 30
 Ala Phe

23

24

配列番号: 30

配列の長さ: 47

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、配列*

*の長さ36であって9番、26番、及び35番に Cysを有するペプチドの、9番の Cysと26番の Cysとがジスルフィド結合し、上記配列の長さ36のペプチドの35番の Cysが、配列の長さ11であって10番にCysを有するペプチドの10番の Cysとがジスルフィド結合している。

【0066】

配列:

Val Ser Gln Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn

1 5 10 15

Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp

20 25 30

Ser Pro Ile Gln Cys Ile

35

Gly Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala

1 5 10

配列番号: 31

配列の長さ: 5

配列の型: アミノ酸

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: ペプチド

配列の特徴: このペプチド、およびこのペプチドをフラグメントとして含むペプチド。下記配列において、Xaa※

※は Cysを除く任意のアミノ酸残基を示す。

【0067】

配列:

Lys Xaa Xaa Xaa Lys

1 5

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

片内整理番号

FI

技術表示箇所

A61K 37/18